

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660241

研究課題名（和文）育児放棄/うつ病モデルとしてのアトピー性皮膚炎モデルNC/Tndマウスの有用性

研究課題名（英文）The availability of NC/Tnd mouse, a model for human atopic dermatitis, as a maternal neglect model

研究代表者

辻野 久美子（Tsujino, Kumiko）

鳥取大学・農学部・講師

研究者番号：10362899

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000 円

研究成果の概要（和文）：アトピー性皮膚炎モデルNC/Tndマウスは、環境の変化で母親が養育放棄・食殺行動する傾向があり、特に冬季繁殖においてその傾向が強くなる。我々は、この原因は環境温度のわずかな低下に起因すると仮説を立て、軽度低温環境でNC/Tndマウスの母性行動を観察した。軽度低温環境において、養育放棄・食殺を行った母親が著しく増加した。一方、養育を行った母親の養育行動は、積極的かつ優れていた。ところが、適切な養育を受けたはずの子に著しい発育不良と生存率の低下がみられた。今後さらなる解明が必要であるが、NC/Tndマウスは母性行動異常の解明に極めて有用であり、新たな発見を提供してくれるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The NC/Tnd mouse, which is formerly known as NC/NgaTnd, is a spontaneous model of human atopic dermatitis. NC/Tnd mothers tend to neglect her pups and to display infanticide caused by slight environmental changes. We found that the number of NC/Tnd mothers display infanticide significantly increase in winter. Thus, we hypothesized that the infanticidal behavior of NC/Tnd mothers is induced by slight low temperature environment. In slight low temperature environment, the infanticidal rate of NC/Tnd mothers significantly increased, whereas that of BALB/c mothers, which are control mice, did not. On the other hand, the maternal behavior of NC/Tnd mothers did not display infanticide was active and excellent. However, the NC/Tnd pups showed marked inadequate growth and significant decreased survival despite being raised with adequate maternal care by their mothers. There is possibility that NC/Tnd mice are useful as a new model to clarify the mechanism of abnormality in maternal behavior.

研究分野：母性行動異常およびアレルギー性皮膚炎

キーワード：養育放棄 母性行動異常 食殺行動 アトピー性皮膚炎 NC/Tndマウス うつ病

1. 研究開始当初の背景

繁殖活動は、生物が種を存続するために最も重要な活動の1つである。哺乳類の繁殖活動は、2つの異なる行動に分けられる。1つは自らと同じ種の個体(子)を作る生殖行動、もう一つは、子を養育する母性行動である。母性行動は、子の生存だけでなく、子が自立するために必要な身体および精神の発育にも大きな影響を与えることから、繁殖活動の成功にとって必要不可欠な行動であり、母性行動異常は、種の存続が危ぶまれる深刻な繁殖障害である。

近年、増加の一途をたどる母親による養育放棄・幼児虐待は、深刻な社会問題となっており、早急な解決策が求められている。母性行動異常を解明するため、母性行動について多くの研究が行われている。視床下部内側視索前野、分界条床核、外側中隔、海馬、扁桃体などの脳領域は、母性行動に関連する領域であるとされ、オキシトシン、バソプレッシン、プロラクチン、セロトニン、ドーパミンなど多くの神経伝達物質の受容体の発現が確認されている。現在、オキシトシンレセプター、トリプトファンハイドロキシラーゼ2やドーパミンD2レセプターなどのノックアウトマウスが、様々な母性行動異常モデルマウスとして開発されており、個々の神経伝達物質について、その作用機序が解明されつつある。しかし、多くの神経伝達物質が関与する母性行動の制御は複雑であり、これらの神経伝達物質がどのように関連しているのか未だ解明されていない。多岐にわたる神経伝達物質の相互関連を解明するためには、人為的処置を施さずとも母性行動異常を自然発症する疾患モデルを利用することが好ましいが、未だこのようなモデル動物は開発されていない。

アトピー性皮膚炎(以下AD)自然発症モデルNC/Tndマウスは、多くのADの病態解明や治療薬の開発に使用されている。2003年より我々の研究室で飼育されているNC/Tndマウスは、生殖能力には異常は認められないが、母親マウスによる子に対する養育放棄・食殺行動が多く見られる傾向がある。我々は、冬季繁殖において特にこの傾向が著しく現れることに気づき、NC/Tndマウスを母性行動異常自然発症モデルとして用いることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、冬季繁殖におけるNC/Tndマウスの母親による子に対する養育放棄・食殺行動の著しい増加は、飼育環境温度のわずかな低下に起因すると仮説を立て、軽度低温環境下におけるNC/Tndマウスの母性行動を観察し、母性行動異常自然発症モデルとしての有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

実験には、我々研究室で系統維持されてきたNC/TndマウスおよびBALB/cマウス(対照群)

を使用した。室内温度を23 (以下、RTS23)および19 (以下、RTS19)に設定された部屋において、10週齢のNC/Tnd未経産雌マウスを同系統同週齢雄マウスと交配させ、出産(産後0日とする。以下、PND0)からPND21まで、その母性行動を観察した。出産後毎朝8時に子の生存を確認し、全ての子を食殺もしくは死亡させた母親を養育放棄・食殺を行った個体とみなした。養育を行った個体について、2時間あたりの巣の中にいる時間(the time on the nest)、授乳姿勢をとる行動(arched back)、子マウスを舐める行動(licking/grooming)、および巣の手入れをする行動(nesting)の割合を調べた。さらに、巣から離れた子連れ戻す行動(pup-retrieval)および巣作り行動(nest-building)を観察するため、一旦母と子をホームケージから別々に取り出し、巣を完全に崩してのち子2匹を巣のあった角とは反対の2角に1匹ずつ置き、母マウスを巣のあった角に戻して母マウスが子を巣に連れ戻すまでの時間および壊れた巣を作り直し始めるまでの時間を計測した。母性攻撃行動(maternal aggression)の観察では、母と子のいるケージへ交配未経験10週齢のC57BL/6雄マウスを入れ、母マウスが雄マウスを攻撃し始めるまでの時間および攻撃回数を計測した。これらの母性行動の観察は、PND4からPND6の間で行われた。子の発育状態を調べるため、PND4およびPND21における子の体重および生存個体数を記録した。NC/Tndマウスはコンベンショナル環境下においてADを自然発症する。養育放棄・食殺行動に対する皮膚炎の影響を調べるため、養育を行った個体(PND21)および養育放棄・食殺を行った個体(養育放棄・食殺行動を確認した直後)について、皮膚臨床症状重症度(Clinical Skin Severity Score、以下CSSS)の評価を行った。交配実験は5回行い、実験で使った個体数は1群あたり21匹から36匹であった。

4. 研究成果

実験期間中のRTS23およびRTS19における実際の室内温度は、 23.2 ± 0.4 および 19.7 ± 0.7 (mean $\pm$ SE, n=5)で、設定した温度を概ね維持しており、RTS23とRTS19の間に有意差が認められた。湿度については、実験期間中変動が大きかったものの、 58.2 ± 6.8 および 49.1 ± 10.8 (mean $\pm$ SE, n=5)であり、RTS23とRTS19の間に有意差はなく、極端な乾燥・多湿ではなかった。

BALB/cマウスおよびNC/Tndマウスは、ともに、RTS23 (94.0 ± 7.3 および 91.3 ± 6.4 , mean $\pm$ SD, n=5)およびRTS19 (93.4 ± 8.1 および 95.4 ± 5.6 , mean $\pm$ SD, n=5)のいずれにおいても、90%以上の高い出産率を示し、両マウス間および飼育温度の違いによって有意差はなかった。また、出産数においても、BALB/cマウスとNC/Tndマウスの間、および、RTS23 (6.2 ± 2.1 および 5.9 ± 2.0 , mean $\pm$ SD, n=5)

およびRTS19 (5.4 ± 1.9 および 5.3 ± 1.6 , $\text{mean} \pm \text{SD}$, $n=5$) の間で有意差は認められなかった。

養育放棄・食殺を行った母親マウスの割合 (以下、Infanticidal rate) について調べた (図1a、1b)。RTS23において、BALB/cマウスとNC/Tndマウスの中でInfanticidal rateに有意差は認められなかったが、NC/Tndマウスの方が高い傾向にあった (図1a)。RTS19において、BALB/cマウスはRTS23飼育時と比べてInfanticidal rateの増加が認められたが、有意差は認められなかった (図1a)。一方、NC/Tndマウスは、RTS23飼育時と比べて著しい有意なInfanticidal rateの増加が認められ、同じRTS19で飼育されたBALB/cマウスと比較しても、その値は有意に高いものであった (図1a)。また、両マウスで見られた養育放棄・食殺行動のほとんどがPND0からPND3に見られ、養育放棄・食殺行動が見られる時期について両マウス間で有意差はなかった (図1b)。次に、ADの影響を調べるためCSSSの評価を行ったところ、養育を行った個体と養育放棄・食殺を行った個体 (0.7 ± 1.3 および 1.0 ± 1.7 , $\text{median} \pm \text{IQR}$, $n=32$ および $n=27$) の間に有意差はなかった (図2)。これらのCSSSの値は、激しいかゆみもなく、ほとんど皮膚症状が現れていないことを意味しており、少なくともADの激しいかゆみや皮膚炎による不快感がNC/Tnd母マウスの養育に対する意欲を喪失させているわけではないように思われた。

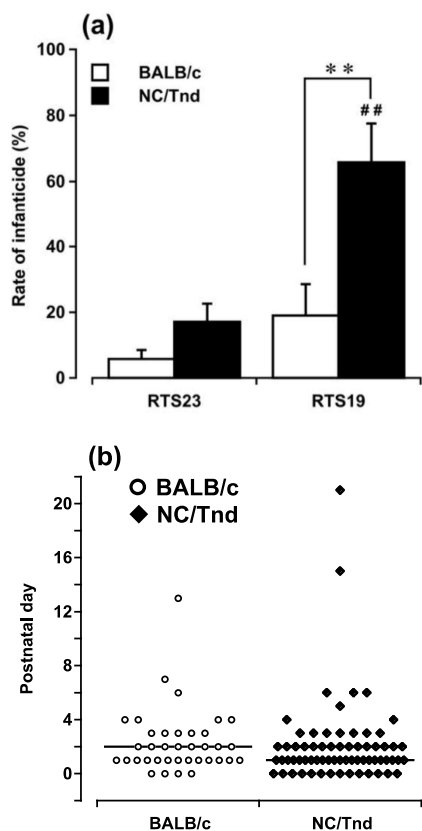


図1. (a) 養育放棄・食殺を行った母マウスの割合 ($\text{mean} \pm \text{SD}$, $n=5$)、(b) 養育放棄・食殺

を行った時期 ($\text{median} \pm \text{IQR}$, $n(\text{BALB/c})=35$, $n(\text{NC/Tnd})=67$)

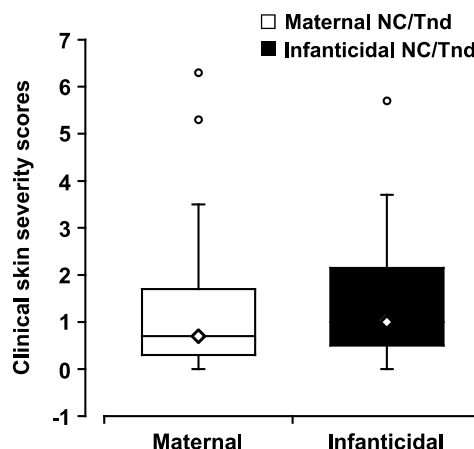


図2. NC/Tndマウスにおける皮膚臨床症状重症度 (Maternal: 養育を行った個体、Infanticidal: 養育放棄・食殺を行った個体)

NC/Tndマウスの母性行動の特徴を調べるため、養育を行った個体の行動観察を行った。the time on the nest、arched back、およびlicking/groomingについて、RTS23およびRTS19のどちらにおいても、NC/TndマウスはBALB/cマウスに比べて有意に多くの時間を費やしていた (図3a、3b、3c)。一方、養育行動ではない自分自身の毛づくろい (self-grooming)、巣の中にいるものの子マウスに関わらない (lying on the side)、および巣の外でその他の行動をする (the other actions) については、RTS23およびRTS19のどちらにおいても (RTS19におけるlying on the sideを除く)、BALB/cマウスの方がNC/Tndマウスよりも有意に多くの時間を費やしていた (図3d、3e、3f)。食べる行動 (eating) および巣の手入れ行動 (nesting) については、両マウス間で有意差はなかった (図3g、3h)。この結果から、NC/Tndマウスの方がBALB/cマウスよりも積極的に養育行動を行っているように思われた。また、両マウスともに、飼育温度の低下による有意な養育行動の変化はなく、the other actionsおよびlying on the side (BALB/cマウスのみ) については有意な減少、Eatingについては有意な増加がみられた (図3e、3f、3g)。

pup-retrievalについて、NC/TndマウスとBALB/cマウス間で明らかに異なっていた。飼育温度に関わらず、NC/Tndマウスのほとんどの個体がpup-retrievalを行った (図4a)。一方、BALB/cマウスはわずか20%程度の個体しかpup-retrievalを行わず、両マウス間には有意差が認められた (図4a)。また、pup-retrievalを行った個体について、その行動の早さを両マウス間で比較したところ、飼育温度の違いに関わらず、NC/Tndマウスの方がBALB/cマウスよりも有意に早く子マウスを巣まで連れ戻した (図4b、4c)。この結果

からも、NC/Tndマウスの方がBALB/cマウスよりも積極的かつ器用に養育を行うことがうかがえた。nest-buildingについて、BALB/cマウスは、両飼育温度の間でnest-buildingを行った個体の割合に有意差はみられなかった（図4d）。一方、NC/Tndマウスは、RTS23ではnest-buildingを行った個体の割合はBALB/cマウスと同程度であったが、RTS19では、その割合は明らかに増加し、RTS23飼育時に比べ有意差が認められ、RTS19におけるBALB/cマウスとの間にも有意差があった（図4d）。nest-buildingを開始するまでの時間は、RTS23では両マウスの間で有意差は見られなかったが、RTS19ではNC/Tndマウスにおいて短くなり、RTS23飼育時に比べ有意な時間短縮が見られ、この時間短縮はRTS19のBALB/cマウスとの間においても有意差があった（図4d）。この結果より、NC/Tndマウスは、室温低下による子の体温低下を防ごうとする行動をとったと考えられ、BALB/cマウスよりも子に対する気遣いがあるように思われた。

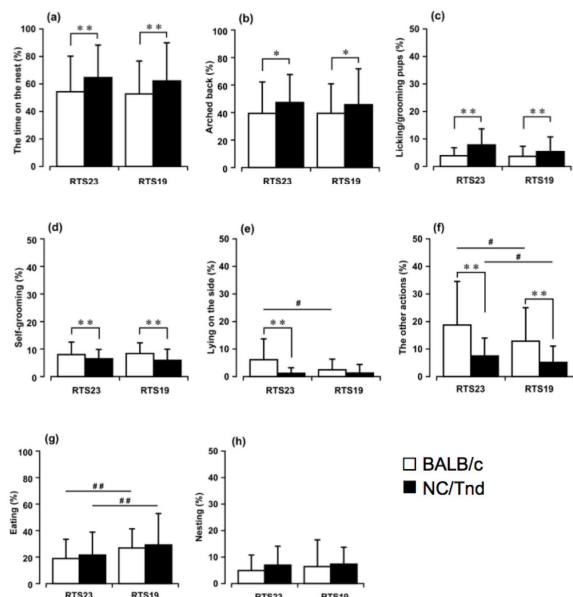


図3. 母性養育行動の割合 (mean $\pm$ SD, RTS23 : n(BALB/c)=71、n(NC/Tnd)=48、RTS19 : n(BALB/c)=37、n(NC/Tnd)=25)

maternal aggressionについては、飼育温度に関わらず、NC/TndマウスはBALB/cマウスに比べmaternal aggressionを行った個体の割合が有意に高く、両マウスとも、飼育温度の違いによってmaternal aggressionを行った個体の割合に有意差は認められなかった（図5a）。また、maternal aggressionを行った個体の攻撃開始時間および攻撃回数は、両マウスの間で有意差はなく、両マウスともに飼育温度の違いによる有意差は認められなかった（図5b）。以上の結果から、NC/Tndマウスの方がBALB/cマウスよりもより積極的に養育を行うことがわかった。

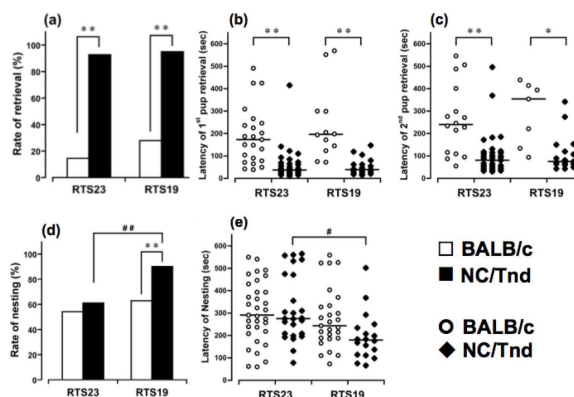


図4. Pup-retrievalおよびnest-building. (a)pup-retrievalを行った個体の割合、(b)子を集めて連れ戻すまでの時間、(c)nest-buildingを行った個体の割合、(d)巣作りを開始するまでの時間 (Bar=median, RTS23 : n(BALB/c)=61、n(NC/Tnd)=41、RTS19 : n(BALB/c)=43、n(NC/Tnd)=20)

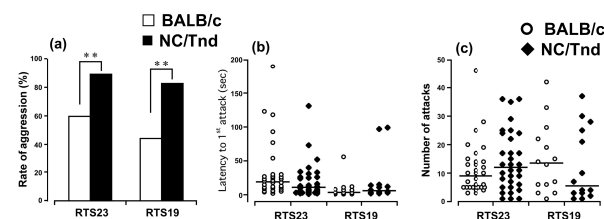


図5. Maternal aggression. (a)maternal aggressionを行った個体の割合、(b)攻撃を開始するまでの時間、(c)攻撃回数 (Bar=median, RTS23 : n(BALB/c)=54、n(NC/Tnd)=36、RTS19 : n(BALB/c)=32、n(NC/Tnd)=17)

ところが、子の発育状態を観察すると、RTS19で養育されたNC/Tndマウスの子には著しい発育不良がみられた（図6a）。RTS19で養育された子は、PND4の時点では両マウスともにRTS23で養育された時に比べ有意な体重減少がみられた（図6b、6c）。その後、RTS19で養育されたBALB/cマウスの子は良好に成長し、PND21ではRTS23で養育された時と比べ有意な体重減少は見られなくなった（図6b）。一方、RTS19で養育されたNC/Tndマウスの子の成長は悪く、PND21においてもRTS23で養育された時と比べ有意な体重減少が見られた（図6c）。さらに、PND4からPND21における子の生存率を調べたところ、飼育温度の低下によって、BALB/cマウスでは子の生存率の有意な低下はみられなかったが、NC/Tndマウスでは子の生存率の有意な低下が見られた（図6d）。以上の結果から、我々研究室で見られた冬季繁殖におけるNC/Tndマウスの母による子に対する養育放棄・食殺行動の著しい増加は、飼育環境温度のわずかな低下に起因することが示唆された。その一方で、NC/Tndマウスは、BALB/cマウスよりも積極的かつ優れた母性行動を示した。本研究では、母性行動に対する

様々な影響を除外するため、長期にわたり NC/Tndマウスと同じ環境でかつ同じ取り扱いを受けてきたBALB/cマウスを対照群として使用した。しかし、BALB/cマウスは養育行動に優れていないとの報告があり、NC/Tndマウスの母性行動の質を評価するには適切な対照群であるとは言い難く、母性行動研究のスタンダードであるC57BL/6マウスと比較する必要がある。さらに、NC/Tndマウスは*rd1*遺伝子異常による網膜変性症に伴う視覚障害があることから、同じ遺伝子異常による視覚障害を持つC3H/HeNとの比較も必要である。

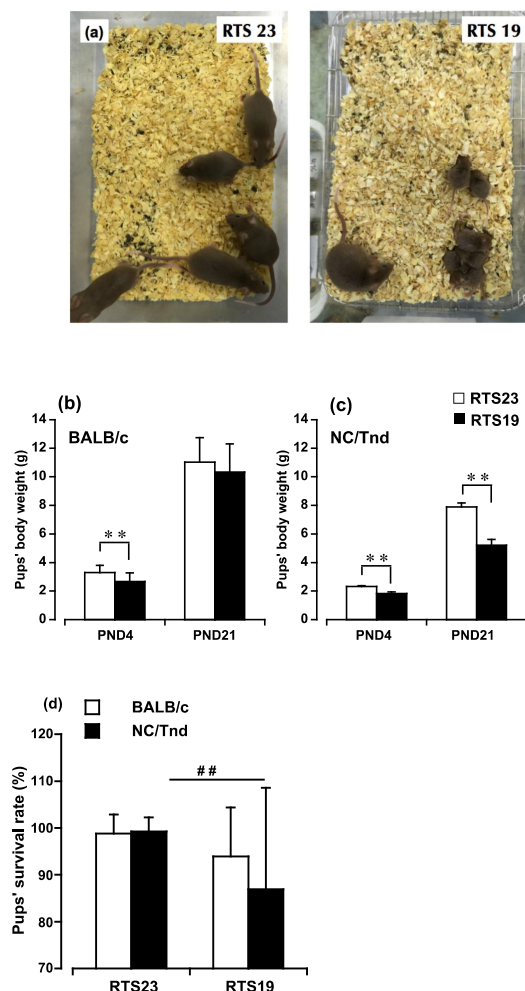


図6. 子マウスの発育および生存率。(a)PND21における子の発育状態、(b)同腹子マウスの平均体重 (mean $\pm$ SE、RTS23 : n(BALB/c)=46、n(NC/Tnd)=31、RTS19 : n(BALB/c)=30、n(NC/Tnd)=17) (c)PND4からPND21における子マウスの生存率

本研究で使用したNC/Tndマウスは、養育を行った個体および養育放棄・食殺を行った個体のいずれも肉眼的に明らかな皮膚症状は呈さず、両者の間でCSSSに有意差は認められなかった。この結果は、かゆみや皮膚炎による不快感が養育放棄・食殺行動を引き起こす要因ではないことを意味しているが、NC/Tndマ

ウスの皮膚ではCSSSによって評価される肉眼的症状に先行して血中IgEの上昇、IL-4およびIL-5の上昇、IFN- γ の低下など2型ヘルパーT細胞主導型反応がすでに生じていることから、本研究の結果だけではADの免疫学的病態を養育放棄・食殺行動を引き起こす要因から除外することはできない。養育放棄・食殺行動と2型ヘルパーT細胞主導型反応との関連については、さらなる研究が必要である。

わずかな低温環境下において、NC/Tndマウスの子は、少なくともBALB/cマウスの母が子に与えた養育よりも積極的な養育を受けたにもかかわらず、BALB/cマウスの子には見られなかった著しい発育不良および生存率の低下を示した。この原因には、母乳分泌が不十分であるなど母側の要因、成長に関わるホルモンの異常があるなど子側の要因どちらも可能性があり、今後さらなる検討が必要である。

母性行動異常の病態は未だ不明な点が多い。NC/Tndマウスによる著しい養育放棄・食殺行動は、自然発症するがゆえに、その複雑な病態を解明するには多くの課題が残されている。しかし、これらの課題を乗り越えていくことで、様々な母性行動関連物質の相互関連が解明され、免疫機構と母性行動異常との関連性に着目した新たな病態および治療法が見出されるかもしれない。このように、NC/Tndマウスは、母性行動異常モデルとして極めて有用であり、さらなる発見を提供してくれるものと我々は期待する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 1 件)

辻野久美子、アトピー性皮膚炎 (AD) 自然発症モデル NC/Tnd マウスの養育放棄モデルとしての可能性、第 158 回日本獣医学会学術大会、2015 年 9 月 8 日、北里大学獣医学部 (青森県・十和田市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻野 久美子 (TSUJINO, Kumiko)

鳥取大学・農学部・講師

研究者番号 : 1 0 3 6 2 8 9 9